



УДК 547.458'118'363.07+576.851.49.097

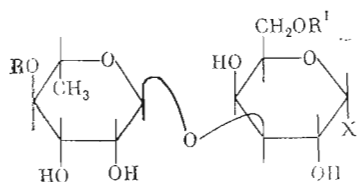
ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНА *SALMONELLA SENFTENBERG*

Данилов Л. Л., Дружинина Т. Н., Шибачев В. Н.,
Ефетков Н. К.

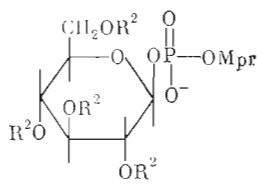
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

При биосинтезе О-специфического полисахарида *Salmonella senftenberg* наблюдается образование промежуточных полипренилпирофосфатолигосахаридов, которые содержат на восстанавливающем конце остаток *D*-галактозы, и полипренилмонофосфатглюкозы, служащей донором остатков глюкозы в процессе биосинтеза [1]. Сходные реакции были продемонстрированы в некоторых других штаммах салмонелл (см. литературу, цитированную в [1]). Недавно мы сообщили о новом методе синтеза полипренилпирофосфатсахаров и получении с помощью этого метода морапренилпирофосфатгалактозы — биологически активного аналога первого промежуточного продукта биосинтеза О-специфических полисахаридов салмонелл [2].

В настоящее время нам удалось распространить этот метод на олигосахариды и впервые получить с его помощью морапренилпирофосфатолигосахариды (Iб) и (IIб), соответствующие по структуре второму и третьему промежуточному продукту биосинтеза, осуществить синтез морапренил-β-*D*-глюкопиранозилфосфата (IVб) и продемонстрировать способность этих соединений функционировать в реакциях биосинтеза О-специфического полисахарида *S. senftenberg*.



(I) - (III)



(IV)

 (IVa) $R^2 = \text{Ac}$

 (IVб) $R^2 = \text{H}$

 (Ia) $R = R^1 = \text{H}, \quad X = \text{OPO}_3^{2-}$

 (Iб) $R = R^1 = \text{H}, \quad X = \text{OPO}(\text{O}^-)\text{OPO}(\text{O}^-)\text{OMPr}$

 (IIa) $R = \beta\text{-D-маннопиранозил}, \quad R^1 = \text{H}, \quad X = \text{OPO}_3^{2-}$

 (IIб) $R = \beta\text{-D-маннопиранозил}, \quad R^1 = \text{H}, \quad X = \text{OPO}(\text{O}^-)\text{OPO}(\text{O}^-)\text{OMPr}$

 (IIв) $R = \beta\text{-D-маннопиранозил}, \quad R^1 = \text{H}, \quad X = \text{OH}$

 (IIIa) $R = \beta\text{-D-маннопиранозил}, \quad R^1 = \alpha\text{-D-глюкопиранозил}, \quad X = \text{OH}$

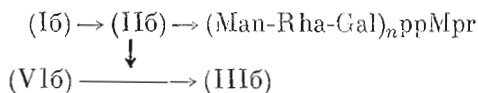
 (IIIб) $R = \beta\text{-D-маннопиранозил}, \quad R^1 = \alpha\text{-D-глюкопиранозил},$
 $X = \text{OPO}(\text{O}^-)\text{OPO}(\text{O}^-)\text{OMPr}$

MPr — остаток морапренола (о структуре морапренола см. [3]).

Фосфаты дисахарида (Ia) и трисахарида (IIa) (их синтез будет описан отдельно) были введены в реакцию с морапренилфосфоимидазолидом [2] в условиях, аналогичных синтезу морапренилпирофосфатгалактозы: двукратный избыток бис(три-*n*-октиламмониевых) солей олигосахаридфосфатов относительно имидазолида, растворитель — смесь тетрагидрофуран — Me₂SO (1 : 1), 16 ч при ~20° С. Продукты реакции очищали ионообменной хроматографией на DE-52 в AcO⁻-форме (Whatman, Англия). Производное (Ib) было выделено с выходом 25%, а (IIb) — с выходом 30%. Полученные соединения были однородны при ТСХ на SiO₂ (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4; *R_f* 0,10 для (Ib) и 0,05 для (IIb). Их строение подтверждено определением отношения двойная связь (модификация методики [4]) — кислотолабильный фосфат [5] и характерной деградацией под действием 40%-ного водного фенола (70° С, 10 мин) до олигосахаридпирофосфатов, а под действием аммиака в водном метаноле (~20° С, 30 мин) до циклофосфатов олигосахаридов и морапренилфосфата.

Взаимодействие 1,2-*O*-*трет*-бутилортоацетил-3,4,6-три-*O*-ацетил- α -*D*-глюкопиранозы с морапренилфосфатом в условиях, аналогичных описаным ранее для синтеза цитронеллил- β -*D*-глюкопиранозилфосфата [6] (бензол — нитрометан, 2 : 1; 25 мин, ~20° С), привело к соединению (IVa), которое было очищено с помощью ионообменной хроматографии и подвергнуто дезацетиливанию (30 мин, ~20° С) действием 0,2%-ного раствора метилата натрия в смеси бензол — метанол, 1 : 2. Выход продукта (IVb) 45%, *R_f* 0,75 (ТСХ, условия см. выше), отношение двойная связь — кислотолабильный фосфат близко к теоретическому. Продукт устойчив к мягкой обработке водным фенолом, но при более длительном гидролизе (3 ч, 70° С) дает гликозилфосфат.

Для проверки биологической активности синтезированных соединений были использованы реакции, катализируемые препаратом растворимых гликозилтрансфераз и мембранным препаратом из *S. senftenberg* (получение ферментных препаратов и методы анализа описаны в работах [1, 7]).



Инкубация морапренилфосфата (Ib) (0,05–0,35 мМ, вещество вводилось в реакцию в виде раствора в 0,2% твине-85) и GDP-[¹⁴C]Man (0,37 мМ) с препаратом растворимых гликозилтрансфераз в стандартных условиях (10 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-ацетат, pH 8,5) приводила к включению радиоактивности в липидную фракцию, что связано с образованием дисахарида (IIb), содержащего [¹⁴C]Man (IIb*). Скорость реакции зависит от концентрации (Ib), *K_m* ~ 10 мкМ. Дегградация продукта ферментной реакции под действием фенола и последующая обработка фосфатазой [8] приводила к трисахариду (IIв), идентичному синтетическому образцу [9], *R_{Gal}* 0,62 (БХ, в системе *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3, система А). Препарат (IIb*), полученный ферментативной реакцией из (Ib), эффективно полимеризовался под действием препарата бактериальных мембран в условиях, описанных ранее [1]. Полимерный продукт в отличие от соединения (IIb*) при БХ в системе этанол — 1 М ацетат аммония, 7 : 3 (pH 7,5), оставался на старте. Зона полимера содержала >90% радиоактивности.

При инкубации соединения (Ib) (0,33 мМ) и GDP-Man (0,25 мМ) или соединения (IIb) (0,125 мМ) с препаратом растворимых гликозилтрансфераз в присутствии UDP-[¹⁴C]Glc (0,25 мМ) и морапренилфосфата (0,40 мМ) (для образования в инкубационной смеси (IVb) с ¹⁴C-меченой глюкозой) происходило образование радиоактивного продукта (IIIb), олигосахаридный фрагмент которого, полученный после описанной выше деградации, идентичен синтетическому образцу тетрасахарида (IIIa) [10], *R_{Gal}* 0,40 (система А). Аналогичный продукт образовывался при инкубации синтетического (IVb) (0,5 мМ) с ферментным препаратом в присутствии

UDP-Gal, dTDP-Rha, GDP-[^{14}C]Man (каждый 0,25 мМ) и морепренилфосфата (0,5 мМ), обеспечивающих образование в инкубационной смеси меченого (IIб*).

Таким образом, для синтезированных соединений продемонстрирована способность вступать в реакции биосинтеза О-специфического полисахарида с маннозилтрансферазой, глюкозилтрансферазой и полимеразой *S. senftenberg*. Эти результаты окончательно подтверждают структуру полипренольных промежуточных соединений при биосинтезе О-антигена в этом виде микроорганизмов.

Авторы глубоко благодарны А. Я. Черняку, А. В. Николаеву, М. В. Овчинникову и В. И. Торгову за предоставление образцов синтетических олигосахаридов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шибяев В. Н., Дружинина Т. Н., Попова А. Н., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А. (1979) Биоорг. химия, 5, 1071–1082.
2. Шибяев В. Н., Данилов Л. Л., Чекуничков В. Н., Кусов Ю. Ю., Кочетков Н. К. (1979) Биоорг. химия, 5, 308–309.
3. Вергунова Г. И., Глуходед И. С., Данилов Л. Л., Елисева Г. И., Кочетков Н. К., Троицкий М. Ф., Усов А. И., Шашков А. С., Шибяев В. Н. (1977) Биоорг. химия, 3, 1484–1492.
4. Fritz J. S., Wood G. E. (1968) Anal. Chem., 40, 134–139.
5. Hess H. H., Derr J. E. (1975) Anal. Biochem., 63, 607–613.
6. Данилов Л. Л., Волкова Л. В., Евстигнеева Р. П. (1977) Ж. общ. химии, 47, 2137–2139.
7. Шибяев В. Н., Кусов Ю. Ю., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. (1978) Биоорг. химия, 4, 47–56.
8. Шибяев В. Н., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Дружинина Т. Н., Кочетков Н. К. (1978) Биоорг. химия, 4, 249–256.
9. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Николаев А. В. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2578–2581.
10. Kochetkov N. K., Malysheva N. N., Torgov V. I., Klimov E. M. (1977) Carbohydr. Res., 54, 269–274.

Поступило в редакцию
22.X.1979

CHEMICAL SYNTHESIS OF THE INTERMEDIATES OF *SALMONELLA* *SENFTENBERG* O-ANTIGEN BIOSYNTHESIS

DANILOV L. L., DRUZHININA T. N., SHIBAEV V. N., KOCHETKOV N. K.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

P¹-Moraprenyl-P²-(α -L-rhamnopyranosyl-1-3- α -D-galactopyranosyl) pyrophosphate and P¹-moraprenyl-P²-(β -D-mannopyranosyl-1-4- α -L-rhamnopyranosyl-1-3- α -D-galactopyranosyl) pyrophosphate were prepared by the reaction of corresponding unprotected oligosaccharide prostates with moraprenyl phosphoimidazolidate. The reaction of α -D-glucopyranose *tert*-butylorthoacetate with moraprenyl phosphate yielded moraprenyl β -D-glucopyranosyl phosphate. These compounds were able to interact with the enzymes of the biosynthesis of O-specific polysaccharide of *Salmonella senftenberg*.

Технический редактор Е. С. Кузьмишкина

Сдано в набор 20.12.79 Подписано к печати 30.01.80 Т-01419 Формат бумаги 70×108¹/₁₆
Высокая печать Уст. печ. л. 14,0+1 вкл. Уч.-изд. л. 14,7 Бум. л. 3,0 Тираж 879 экз. Зак. 2583

Издательство «Наука», 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 10